Medizinische Klinik und Poliklinik E
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. H. Zimmermann

UNTERSUCHUNGEN ZUR PHARMAKOKINETIK SUBCUTAN INJIZIERTEN DES-PHE-INSULINS

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Victor Heinzle

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543905_0086

Medizinische Klinik und Poliklinik E
der Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. H. Zimmermann

UNTERSUCHUNGEN ZUR PHARMAKOKINETIK SUBCUTAN INJIZIERTEN DES-PHE-INSULINS.

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Zahnmedizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Victor Heinzle

1983

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Brüster

Referent
gez.: Priv. Doz. H. J. Cüppers

Korreferent
gez.: Prof. Dr. F. Schübel

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1-2
1.1	Zur Pathogenese der Insulinallergie und Insulinresistenz	3
1.2	Herstellung der DES-PHE-Insuline und Wirkungsweise	4
1.3	Pharmazeutische Zubereitung und klinische Wirkung DES-PHE-Insulin	4-6
1.4	Methoden zur Bestimmung der subcutanen Insulinabsorptionsraten	7-8
2.	Methodik	9-10
2.1	Statistische und pharmakokinetische Berechnungen	10-13
3.	Ergebnisse	14-15
3.1	Diskussion	16
4.	Untersuchung zur Absorption von Optisulin (Hoe 01) S und Optisulin Long (Hoe 05) S	17
4.1	Ergebnisse	17-21
4.2	Diskussion	22-23
5.	Untersuchung zur Absorption von Optisulin (Hoe 01) CS und Optisulin Depot (Hoe 03) CS	24
5.1	Ergebnisse	24-27
5.2	Diskussion	28-29
6.	Zusammenfassung	30
7.	Anhang (Literaturverzeichnis)	31-35
7.1	Danksagung	36
7.2	Lebenslauf	37

1. Einleitung

Die Einführung von Rinder-bzw. Schweineinsulin in die Diabetestherapie durch BANTING und BEST (1922) wirkte seitdem für viele Diabetiker lebensrettend.
Aber schon wenige Jahre nach der ersten klinischen Arbeit über die Insulintherapie von BANTING et al. (1923) berichtete FALTA (1924) über einen insulinrefraktären Patienten.
FALTA nahm an, daß das Insulin nicht am Erfolgsorgan wirksam sei und daß bei diesem Patienten die diabetische Stoffwechselstörung überhaupt nicht auf einer Insuffizienz der Insulinproduktion beruhe, sondern daß die Ursache für diese Stoffwechselstörung irgendwo anders gelegen sein müßte. Im Jahre 1928 berichtete erstmals TUFT über Diabetiker, die auf Insulin allergisch mit Hautrötung oder Quaddeln reagierten, bzw. nach mehrmonatiger Behandlungsdauer eine Insulinresistenz entwickelten. Daß Insulinantikörper ursächlich für die Insulinresistenz in Frage kommen könnten, fanden ARQUILLA (1956) und BERSON (1956) heraus.
Es wurden daher Versuche unternommen, das artfremde Insulin chemisch so abzuändern, daß die biologische Wirksamkeit zwar vollständig erhalten bleibt, jedoch die antigenen Eigenschaften auf ein Minimum reduziert bzw. ganz eliminiert werden.

So versuchten z.B. WEBER et al. (1967) die Abspaltung zweier Aminosäuren (Glycin^{1} Alanin^{12}) an der A-Kette des Insulinmoleküls.
Diese Modifikation ging aber praktisch mit einem Verlust der biologischen Wirksamkeit einher.
Anfang der siebziger Jahre stellten BRANDENBURG (1969) und LINDSAY (1971) fest, daß Rinderinsulin, bei dem chemisch Phenylalanin am N-terminalen Ende der B-Kette abgespalten wird, biologisch ebenso voll aktiv ist wie das nicht modifizierte Insulin. Die antigene Wirkung ist jedoch wesentlich geringer (KERP 1968). Dieses DES-PHE-Insulin mit der verkürzten B-Kette zeigt ausserdem noch den Effekt, daß es nicht zur Mischkristallisation mit nativem Insulin der gleichen Tierspezies neigt (VELCOVSKY et al. 1976).
Dieses Phänomen z.B. wird heute dazu genutzt, unterschiedliche Präparationen von Verzögerungsinsulinen zu gewinnen.
Diese Insuline, "DES-PHE-Insuline" genannt, konnten erfolgreich bei Patienten mit Insulinallergie bzw. antikörperbedingter Insulinresistenz angewandt werden (BRANDENBURG, 1969 und KERP, 1974).

Ob diese DES-PHE-Insuline, die in ihrer blutzuckersenkenden Wirkung den Schweine- und Rinderinsulinen entsprechen, auch gleiches pharmakokinetisches Verhalten zeigen, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

1.1 Zur Pathogenese der Insulinallergie und Insulinresistenz

Wie von ARQUILLA (1956), BERSON (1956) und FANKHAUSER (1976) festgestellt wurde, induziert exogen zugeführtes Insulin als Antigen die Bildung verschiedener Typen gegen Insulin gerichteter Antikörper.
Während zelluläre Antikörper nur in vereinzelten Fällen bei Insulin-Allergien vom verzögerten Typ beobachtet wurden, liessen sich humorale Antikörper in verschiedenen Klassen der Immunglobuline lokalisieren.
Frühantikörper vom IgM-Typ zeigten sich nur in der Initialphase der Insulinbehandlung, während IgA-Antikörper lediglich bei Insulin-Allergien vom Sofort-Typ auftraten.
Demgegenüber persistierten nach den Untersuchungen von KERP et al. (1968) insulinbindende Antikörper vom IgG-Typ während der gesamten Dauer einer Insulinbehandlung.
Innerhalb der IgG-Fraktion liessen sich zwei Antikörperbindungsstellen mit stark unterschiedlicher Affinität zum Insulinantigen aufdecken, die nach der Ansicht der Untersucher für die aktuelle Insulinwirksamkeit von grosser Bedeutung sind. Demzufolge soll besonders die Komponente AK_1 einen starken Insulin-neutralisierenden Effekt aufweisen.

1.2 Herstellung der DES-PHE-Insuline und Wirkungsweise

Rinderinsulin wird mit Phenylisothiocyanat (Ptc) im Molverhältnis 1:2 umgesetzt (BRANDENBURG, 1969; GEIGER, 1973). Es substituiert durch chemische Reaktion nahezu ausschliesslich am Phenylalanin zum Mono-phenylthiocarbamoyl-Derivat.
Das erhaltene Ptc-Insulin wird im Vakuum mit P_2O_5/KOH getrocknet, und danach mit wasserfreier Trifluoressigsäure behandelt (EDMAN-Abbau).
DES-PHE-Insuline haben dieselben biologischen Wirkungen wie ihre vergleichbaren nichtmodifizierten Analoga (SANTEUSANIO et al. 1981).
Dies konnte sowohl an der isolierten Fettzelle der Ratte (GLIEMAN und GAMMELTOFT, 1974), als auch in zahlreichen klinischen Versuchen (FEDERLIN et al. 1979) bewiesen werden.

1.3 Pharmazeutische Zubereitung und klinische Wirkung DES-PHE-Insulin

Insulin und DES-PHE-Insulin wird in verschiedenen pharmazeutischen Zubereitungen angeboten, die durch Wirkungseintritt, Wirkungsmaximum und Wirkungsdauer charakterisiert sind.
So liegt z.B. der Wirkungseintritt der nichtmodifizierten Altinsuline bei ca. 15 Minuten post injektionem. Die Wirkungsdauer beträgt bis zu 6 Stunden und das Wirkungsmaximum wird nach ca. 1,5 Stunden erreicht.

Bei den Verzögerungsinsulinen ist dem Altinsulin eine absorptionsverzögernde Substanz beigegeben (z.B. Protamin oder Zinkionen). Damit liegt die Wirkdauer zwischen 12 und 16 Stunden. Der Initialeffekt tritt erst 1-2 Stunden post injektionem ein, und die Maximalwirkung ist nach 4-8 Stunden zu erwarten.
DES-PHE-Insuline besitzen ein vom nicht modifizierten Insulin abweichendes Löslichkeits- und Kristallisationsverhalten.
Durch Variation der Anteile von DES-PHE-Insulin gelöst, amorph und kristallinem Insulin der gleichen Spezies, sowie des Zinkgehaltes lassen sich Monospezies-Insuline herstellen die das Wirkungsprofil von Verzögerungsinsulinen besitzen. Dabei beruht die Initialwirkung auf dem DES-PHE-Anteil, das kristallisierte Insulin stellt die Verzögerungskomponente dar. So wird die Wirkungsdauer von Optisulin CS (Hoe 01) S welches aus 100% DES-PHE-Insulin besteht mit 5-7 Stunden angegeben, der Wirkungseintritt liegt bei 15 Minuten post injektionem.
Optisulin Depot CS (Hoe 03) S setzt sich zusammen aus 25% DES-PHE und 75% kristallinem Insulin. Dabei tritt die Wirkung erst nach 30 Minuten ein, die Wirkdauer beträgt jedoch 12-16 Stunden. Noch deutlicher zeigt sich der Unterschied beim Optisulin Long CS (Hoe 05) S, welches aus 30% DES-PHE-Insulin und 70% kristallinem Insulin zusammengesetzt ist; der Wirkungseintritt erfolgt 45-60 Minuten post injektionem, die Wirkdauer beträgt bis zu 24 Stunden (Tab. 1).

Präparat	Prüfbezeichnung	Spezies	Wirkungsprofil	Spritz-Eß-Abst Min	Wirkg-dauer Std	Lsg / Susp	Bemerkung
Optisulin CR **Optisulin CS**	Hoe 01 R Hoe 01 S	R S		15 20	5 7	Lsg	100% Desphe-Insulin gelöst
Optisulin-Spezial CS	Hoe 02 S	S		30 - 45	12 - 14	Susp	100% Desphe-Insulin amorph
Optisulin-Depot CR **Optisulin-Depot CS**	Hoe 03 R Hoe 03 S	R S		30	12 - 16	Susp	25% Desphe-Insulin gelöst 75% kristall. Insulin
Optisulin-Long CR **Optisulin-Long CS**	Hoe 05 R Hoe 05 S	R S		45 - 60	20 - 24	Susp	30% Desphe-Insulin amorph 70% kristall. Insulin

Tab. 1: Wirkprofile verschiedener Optisulin-Präparationen.

Unterschiede in der Aminosäuresequenz verschiedener Spezies:

	A-Kette		B-Kette
Position im Molekül	A 8	A 10	B 30
Rind	Alanin	Valin	Alanin
Schwein	Threonin	Isoleucin	Alanin
Mensch	Threonin	Isoleucin	Threonin

Tab. 2: Unterschiede in der Aminosäuresequenz verschiedener Speziesinsuline.

1.4 Methoden zur Bestimmung der subcutanen Insulinabsorptionsraten

Wichtig für den Diabetiker, zur stabilen Normalisierung des Blutzuckers, ist neben dem bereits nachgewiesenen biologischen Effekt hauptsächlich das pharmakologische Verhalten des subcutan injizierten Insulins, insbesondere genaue Kenntnisse über Wirkungseintritt, Wirkungsdauer und Wirkungsmaximum.
Bei der Anwendung von DES-PHE-Insulin interessiert nun besonders, ob sich die Absorption des chemisch modifizierten DES-PHE-Insulins von der anderer, nicht modifizierter Insulinpräparationen wie z.B. Schweineinsulin unterscheidet.
Um das Absorptionsverhalten von subcutan injiziertem Insulin zu untersuchen, stehen uns heute verschiedene Methoden zur Verfügung:

1) die indirekte Methode (BINDER 1969)

2) die direkte Methode mit Bestimmung der Serum-insulinkonzentration

Da jedoch die indirekte Methode verschiedene Nachteile aufweist (BERGER, 1979; CÜPPERS, 1980) wurde nachfolgende Untersuchung mit der direkten Methode durchgeführt.

Als Mass für die Absorption des Insulins aus dem subcutanen Injektionsdepot dient hierbei die Bestimmung der Insulinkonzentration im Serum, mit Hilfe spezifischer Radioimmunoassays (WIDE und PORATH, 1966). Wegen der kurzen Halbwertzeit (ca. 5 Min.) des Insulins, und dem Sistieren der körpereigenen Insulinproduktion durch den raschen Blutzuckerabfall nach der Applikation exogenen

Insulins (BERGER et al. , 1982), eigent sich diese direkte Methode besonders für die Untersuchung der Absorptionskinetik subcutan injizierten Insulins bei Patienten ohne Insulinantikörper.

2. Methodik

Um die Reproduzierbarkeit der direkten Methode zu überprüfen, wurden zunächst an 4 aufeinanderfolgenden Tagen 5 männliche, gesunde und normalgewichtige Versuchspersonen zum Test herangezogen. Nach einer Nahrungskarenz von 8-12 Stunden wurde morgens nüchtern um 7.30 Uhr die Untersuchung gestartet.
Es wurde zunächst über eine Braunüle in der Ellenbeuge ein venöser Zugang gelegt, und mit 0,9% NaCl-Lösung für Blutentnahmen offengehalten. Nach einer Vorperiode von 15 Minuten mit zweimaligen Blutentnahmen bei -15 Minuten und 0 Minuten wurden bei 0 Minuten 10 E Actrapid^{R} subcutan in die Vorderseite des Oberschenkels injiziert. Dabei wurde streng darauf geachtet, daß die Injektionen unter gleichem Injektionswinkel, bei gleicher Injektionstiefe und mit gleicher Injektionsgeschwindigkeit erfolgten.
Für alle Untersuchungen wurden Einmal-Injektions-Kanülen- und Spritzen derselben Herstellerfirma (Plastipak, Becton Dickinson, Heidelberg, West Germany) verwendet. Um ein Zurückfliessen des applizierten Insulins aus dem Stichkanal zu vermeiden, blieb die Injektionsnadel noch ca. 10 Sekunden nach der Injektion liegen.
Die Blutentnahmen erfolgten bei:
-15, 0, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 und 300 Minuten.
Während der gesamten Untersuchung ruhten die Probanden in liegender Position bei Raumtemperatur.

Zur Absicherung evtl. eintretender Hypoglykämien stand immer eine Flasche Traubenzuckerlösung zur intravenösen Infusion bereit.
Am Ende jedes Untersuchungsvormittages wurden die Testpersonen angehalten, unter Aufsicht Kohlenhydrate zu essen.

Die Blutproben wurden nach der Abnahme zentrifugiert, und der Blutzucker im Serum mittels eines Beckman-Glucose-Analyzers gemessen. Die Serum-insulinkonzentrationen wurden radioimmunologisch bestimmt (CÜPPERS, 1980).

2.1 Statistische und pharmakokinetishe Berechnungen:

Folgende statistische Berechnungen wurden benutzt:

A) Mittelwert: $\bar{x} = \frac{x_i}{n}$

n = Anzahl der Messungen

B) Standardabweichung (SD):

$$s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

C) Mittlerer Fehler des Mittelwertes (SEM):

$$s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{s_x^2}{n}}$$

D) Der Unterschied zwischen zwei Mittelwerten von verschiedenen Gruppen wurde anhand des t-Tests nach Student auf Signifikanz geprüft:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_{x_1}^2}{n_1} \quad \frac{s_{x_2}^2}{n_2}}}$$

Wurden identische Gruppen unter verschiedenen Versuchsbedingungen untersucht, so wurden die Unterschiede mit dem gepaarten t-Test auf Signifikanz geprüft:

$$t_{n-1} = \frac{\bar{d}}{\frac{s_d}{\sqrt{n}}}$$

wobei $\bar{d} = \frac{\sum d_i}{n}$ oder $= \bar{x}_1 - \bar{x}_2$ ist,

in Worten dem Mittelwert der Differenzen oder der Differenz der Mittelwerte entspricht.
s_d ist die Standardabweichung der Differenzen.
p 0,05 wurde entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% als signifikant angenommen.

E) Berechnung von $Conc._{max.}$ und $T\ Conc._{max.}$:

Aus den höchsten Serum-Insulin-Spiegeln der einzelnen Probanden einer Untersuchungsgruppe wurde die Maximale Hormonkonzentration -IRI-$_{Conc._{max.}}$ in μU/ml - errechnet.

Der Zeitpunkt, zu dem die maximale Insulin-Konzentration erreicht wurde, wird als T_{max} Minuten der jeweiligen Untersuchungsgruppe bezeichnet. Die Angaben erfolgen als Mittelwert $\pm$ SEM.

F) Berechnung der Fläche unter der Insulin-Konzentrations-Zeitkurve:

Die Fläche unter der Hormonkurve (AUC = area under the curve) wurde berechnet unter Auflösung des Flächenintergrals nach der Trapezoidregel (KLOTZ, 1979) und Aufsummation der trapezförmigen Segmente nach:

$$Cdt = AUC = \frac{1}{2} \quad (y_{n-1} + y_n) \cdot (x_n - x_{n-1})$$

mit y = Konzentration am jeweiligen Messpunkt
und x = Zeit am jeweiligen Messpunkt

G) Berechnung der prozentualen Bioverfügbarkeit von Insulin:

Aus den Flächen der Insulin-Konzentrations-Kurven der verschiedenen Versuchsbedingungen wurde die prozentuale Bioverfügbarkeit des injizierten Insulins innerhalb der ersten 90 Minuten errechnet (RITSCHEL, 1973):

$$\%BV = \frac{AUC_x}{AUC_s} \cdot 100$$

BV = Bioverfügbarkeit
AUC_s = Standardfläche der Kontrollgruppe, die mit 100% angenommen wurde.
AUC_x = jeweilige Vergleichsfläche, die Abweichungen vom Kontrollkollektiv werden als Δ% angegeben.

3. Ergebnisse

Nach der Injektion von 10 E Actrapid® subcutan in den Oberschenkel ergaben sich bei 5 Personen an 4 aufeinanderfolgenden Tagen (n = 20) folgende Durchschnitts-Messwerte:

1.
Die Serum-Insulin-Konzentration steigt von einem Ausgangswert von 4,2 ± 0,3 µU/ml bei 0 Minuten auf einen Maximalwert IRI_{max} von 18,7 ± 1,2 µU/ml an. Das Mittel der SEM von 4 aufeinanderfolgenden Testtagen wurde mit 1,4 ± 0,2 µU/ml errechnet. Dies ist ein Prozentsatz von 7,4 ± 1,3% der $IRI_{conc.\ max}$.

2.
Die durchschnittliche Zeit $IRI_{T\ max}$ zu der die höchste Insulinkonzentration gemessen wurde, wurde mit 100 ± 9 Minuten errechnet.
Das Mittel der SEM von 4 aufeinanderfolgenden Testtagen betrug 16 ± 4 Minuten.

3.
Die Fläche unter der Serum-Insulin/Zeitkurve:
(n = 20)

AUC_{0-300} = 3796 ± 101 µU/ml x min.

Mittel der SEM von 4 aufeinanderfolgenden Testtagen:

AUC_{0-300} = 125 ± 32 µU/ml x min.

Dies ist ein Prozentsatz von 3,4 ± 0,7%
der Gesamtfläche unter der Kurve.

Die Blutzuckerwerte fallen im Durchschnitt
an allen vier Versuchstagen auf einen
Tiefstwert von unter 50 mg/dl ab.

Programm	IRI-Conc.$_{max.}$ (uU/ml)	IRI-T$_{max.}$ (Min.)	AUC (uU/ml x Min.)
10 E Actrapid^{R}	18,7 ± 1,2 SEM	100 ± 9	3796 ± 101
in% von IRI$_{max.}$	7,4 ± 1,3		3,4 ± 0,7

Tab. 3: Maximale Serum-Insulin-Konzentration (IRI$_{conc. max.}$), Zeitpunkt der maximalen Serum-Insulin-Konzentration (IRI$_{T. max.}$) und Fläche unter der Kurve (AUC) nach Injektion von 10 E Actrapid an 4 aufeinanderfolgenden Tagen bei 5 Probanden, Mittelwerte ± SEM.

3.1 Diskussion

Für biologische Untersuchungen, die ja oft mit hoher Streubreite bei den einzelnen Individuen behaftet sind, gilt ein Prozentsatz des Fehlers von unter 10% bereits als ausreichend genau (LEDERMANN, GLOCKE, 1981). Da nun die vorangegangene Untersuchung einen prozentualen Fehler von 7,4 ± 1,3% für $IRI_{conc\ max.}$ und 3,4 ± 0,7% für die Fläche unter der Kurve AUC_{0-300} ergab, scheint diese direkte Methode hinreichend valide zu sein, um pharmakokinetische Untersuchungen zur Insulinabsorption durchzuführen.
Mit dieser obengenannten Methode wurden nun die folgenden Untersuchungen zur Absorptionskinetik von DES-PHE-Insulinen durchgeführt:

1) Optisulin (Hoe 01) CS/Optisulin Long (Hoe 05) CS

2) Optisulin (Hoe 01) CS/Optisulin Depot (Hoe 03) CS

4. Untersuchung zur Absorption von Optisulin (Hoe 01) S und Optisulin Long (Hoe 05) S

Nach der oben bereits beschriebenen Methode wurden 6 Probanden in einer Randomisierungsliste nach vier verschiedenen Programmen untersucht:

1) 10 E Optisulin (Hoe 01) S allein subcutan in den Oberschenkel.
2) 10 E Optisulin (Hoe 01) S und 16 E Optisulin Long (Hoe 05) S an getrennten Injektionsstellen (linker und rechter Oberschenkel) simultan appliziert.
3) 10 E Optisulin (Hoe 01) S und 16 E Optisulin Long (Hoe 05) S zusammen in einer Spritze aufgezogen und sofort nach dem Mischen subcutan in den Oberschenkel injiziert.
4) wie 3), jedoch 5 Minuten nach dem mischen.

Die Blutabnahmen erfolgten zu folgenden Zeiten:

-15, 0, 10, 20, 30, 40, 60, 75, 90, 105, 120, 135 und 150 Minuten
Die Injektion erfolgte bei 0 Minuten.

4.1 Ergebnisse

Nach der Injektion von 10 E Optisulin (Hoe 01) S bei 0 Minuten steigt die Seruminsulinkonzentration ausgehend von 6,7 $\pm$ 0,7 µU/ml bei 0 Minuten auf eine maximale Konzentration von 11,6 $\pm$ 1,8 µU/ml $IRI_{conc.\ max.}$ an.

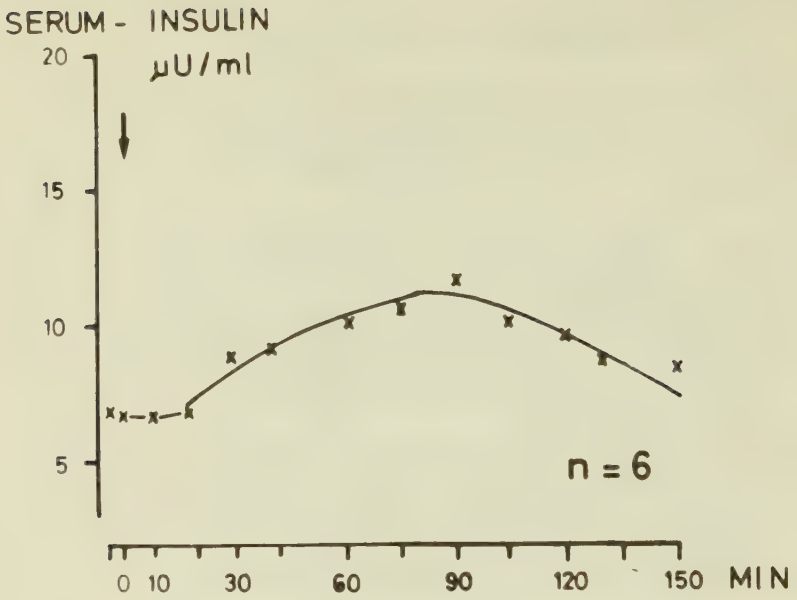

Abb. 1: Serum-Insulin-Konzentration nach subcutaner Injektion von 10 E Optisulin (Hoe 01) CS.

Die maximale Konzentration in Abb. 1 wird nach 90 ± 7 Minuten IRI-T_{max} erreicht.
Nach 150 Minuten sinkt der Insulinspiegel auf 8,2 ± 0,9 µU/ml ab.

Der Blutzuckerspiegel sinkt von einer Konzentration von 75 mg/dl bei 0 Minuten auf einen Wert von 51 mg/dl bei 100 Minuten ab.
Die Berechnung der Fläche unter der Insulin-Konzentrations-Zeitkurve ergibt einen Wert von 1392 ± 165 µU/ml x Minuten (Abb. 1)

Nach der subcutanen Injektion von 10 E Optisulin (Hoe 01) CS und 16 E Optisulin Long (Hoe 05) CS getrennt in beide Oberschenkel, steigt die Seruminsulinkonzentration von ca. 7,3 ± 0,8 µU/ml bei 0 Minuten nach der Injektion auf eine maximale Konzentration von 12,8 ± 3,6 µU/ml $IRI_{conc.\ max.}$ an.
Dieser Insulinspiegel wurde nach 105 ± 15 Minuten $IRI\text{-}T_{max.}$ post Injektionem erreicht.
Der Blutglukosespiegel fällt von etwa 75 mg/dl bei 0 Minuten auf einen Tiefstwert von 52 mg/dl nach 150 ± 17 Minuten ab.
Die errechnete Fläche unter der Insulinkonzentrations-Zeitkurve ergibt einen Wert von 1520 ± 314 µU/ml x Minuten (Abb. 1).

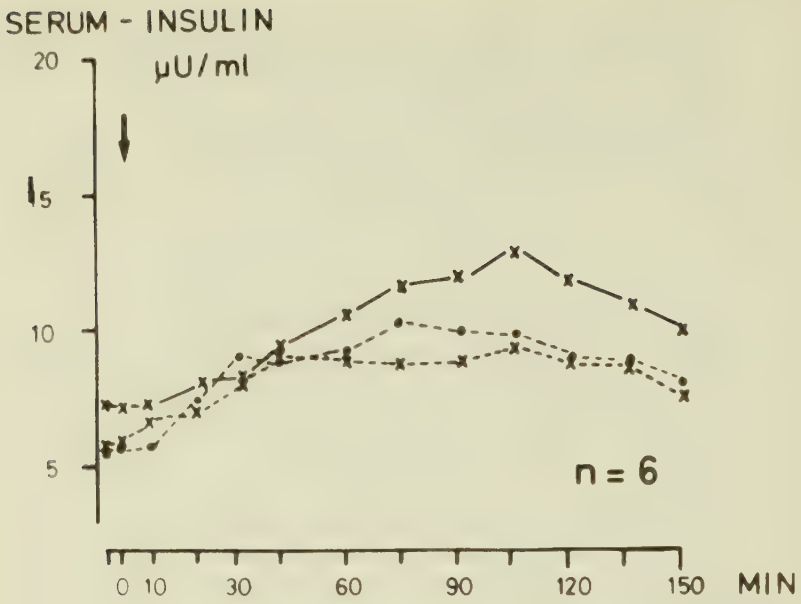

Abb. 2: Seruminsulin-Konzentrationen nach subcutaner Injektion von 10 E Optisulin (Hoe 01) CS und 16 E Optisulin (Hoe 05) CS

—— x —— x —— getrennt injiziert

-x- -x- -x- -x- gemischt injiziert

– – • – – • – – gemischt und nach 5 Minuten injiziert

Bei der Injektion beider Insuline unmittelbar nach dem Mischen steigt der Serum-Insulinspiegel ausgehend von einer Nüchternblutkonzentration von 5,8 ± 0,6 µU/ml bei 0 Minuten auf einen Wert von 9,2 ± 1,4 µU/ml $IRI_{conc.\ max.}$ an.

Dieser Insulinspiegel wurde bei 105 ± 12 Minuten gemessen ($IRI_{T.\ max.}$).

Die Blutglukose sinkt von 81 mg/dl bei 0 Minuten auf 53 mg/dl nach 135 ± 14 Minuten ab.
Die Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve beträgt 1248 ± 148 µU/ml x Min.
Wird 5 Minuten nach der Durchmischung von 10 E Optisulin CS (Hoe 01) und 16 E Optisulin Long (Hoe 05) in einer Spritze subcutan in den Oberschenkel injiziert, so steigt der Insulinspiegel ausgehend von 5,6 ± 0,5 µU/ml bei 0 Minuten auf 10,1 ± 1,4 µU/ml $IRI_{conc.\ max.}$ an.

Dieser Wert wird nach ca. 75 ± 8 Minuten erreicht ($IRI_{T.\ max.}$).
Die Blutglukosekonzentration fällt von 68 mg/dl bei 0 Minuten auf einen Tiefstwert von 51 mg/dl bei 120 ± 7 Minuten ab.
Die berechnete Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve beträgt 1283 ± 139 µU/ml x Min.

4.2 Diskussion

Bei allen vier Versuchsprogrammen zeigt sich, daß der blutzuckersenkende Effekt von DES-PHE-Insulin durchaus dem Wirkprofil gleicher Mengen von Schweine- oder Humaninsulin entspricht. Allerdings entsprechen sowohl die Seruminsulinkonzentrationen im Verlauf von 150 Minuten als auch die Konzentrationsspitzen ($IRI_{conc.\ max}$) in keinem der vier Versuche den in anderen Untersuchungen (CÜPPERS, 1980) gefundenen Insulinspiegel.
Im Vergleich zu den Schweineinsulin-Absorptions-Studien liegen die Ergebnisse der modifizierten Insuline alle um ca. 35% niedriger.
Zwar wird das Konzentrationsmaximum früher erreicht, ist aber deutlich niedriger.
Auch scheint es bei den DES-PHE-Insulinen (Optisulin CS und Optisulin Long CS) nach Mischung von kurz- und langwirkendem Insulin zu einer geringeren Absorption des Altinsulin-Anteils zu kommen. $IRI_{conc.max.}$ bei getrennter Injektion beträgt 12,8 $\pm$ 3,6 µU/ml. Nach Mischung und sofortiger Injektion wird ein Wert von 9,2 $\pm$ 1,4 µU/ml gemessen, während bei der Injektion 5 Minuten nach dem mischen die $IRI_{conc.max.}$ 10,1 $\pm$ 1,4 µU/ml beträgt.
Die Ursache hierfür könnten die in den Verzögerungsinsulinen verwendeten Zusatzstoffe wie z.B. Zink sein. So beobachtete z.B. HARROWER (1975) bei der Kontrolle von Blutglukoseverläufen der von ihm behandelten Diabetiker, daß die Initialwirkung einer Mischung von Alt- und Protamin-Zink-Insulin nachließ, während die Depotwirkung verstärkt wurde.

Er vermutete eine Konversion des Altinsulin in die Depotform durch die Anwesenheit von freien Zinkionen.
Untersuchungen von CÜPPERS (1980) unterstützen diese Vermutung.
So könnten freie Zinkionen während des Mischens in der Spritze einen Teil des Alt-Insuline (Optisulin CS Hoe 01 S) als amorphes Insulin mit intermediärer Wirkung ausfällen. Mit ähnlicher Fragestellung untersuchte GALLOWAY (1981) Mischungen des Zinkinsulins Lente^{R} mit einem Altinsulin. Bei in vitro Untersuchungen fand er eine Konversion des Altinsulins in die Depotform bei Altinsulin/Lente^{R}-Mischungen im Verhältnis 1:3 und 1:2 nach 15-minütiger Lagerung.
Waren die Präparate im Verhältnis 1:1, 2:1 oder 3:1 gemischt, so zeigte sich kein signifikanter Übergang von Altinsulinmolekülen in Zinkinsulinkristalle.
Aus den bisher genannten Arbeiten geht eindeutig hervor, daß die wichtigsten Veränderungen bei freien Insulinmischungen den Anstieg der Absorption des Altinsulinanteils bis zum Absorptionsmaximum $[IRI]_{max.}$ betreffen. Vergleicht man nun bei den vier Kurven den Anstieg der Seruminsulinkonzentration, so fällt ein geringfügig schwächerer Anstieg der Seruminsulinspiegel bei den gemischt injizierten Insulinen auf, der sich jedoch nicht signifikant unterscheidet.

5. Untersuchung zur Absorption von Optisulin (Hoe 01) CS und Optisulin Depot (Hoe 03) CS

Die Versuchsmodelle wurden wie oben beschrieben übernommen. Als Verzögerungsinsulin wurde jedoch Optisulin Depot (Hoe 03) CS verwendet, welches aus 75% kristallinem und 25% gelöstem Insulin zusammengesetzt ist

5.1 Ergebnisse

Zunächst werden 10 E Optisulin (Hoe 01) CS und 16 E Optisulin Depot (Hoe 03) CS getrennt in beide Oberschenkel injiziert; das Serum-Insulin steigt von 5,0 ± 0,2 µU/ml bei 0 Minuten auf eine maximale Konzentration von 13,6 ± 4,0 µU/ml $IRI_{conc.\ max}$ an (Abb. 3).
Dieser Wert wird nach 150 ± 12 Minuten IRI-$T_{max.}$ erreicht.
Der Blutglukosespiegel sinkt von ca. 78 mg/dl bei 0 Minuten auf 49 mg/dl bei 135 Minuten ab.
Die Fläche unter der Seruminsulinkurve beträgt 1549 ± 103 µU/ml x Min.

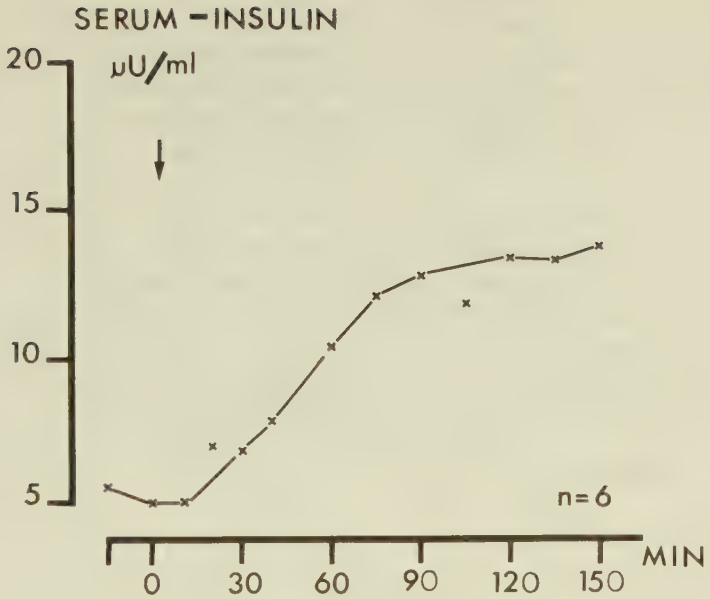

Abb. 3: Seruminsulinkonzentration nach Injektion von 10 E Optisulin (Hoe 01) CS und 16 E Optisulin Depot (Hoe 03) CS subcutan, getrennt in beide Oberschenkel

Nach der Durchmischung von 10 E Optisulin (Hoe 01) CS und 16 E Optisulin Depot (Hoe 03) CS gemeinsam in einer Spritze und sofortige Injektion in den Oberschenkel steigt die Seruminsulinkonzentration von 5,0 ± 0,2 uU/ml bei 0 Minuten auf einen Höchstwert von 15,8 ± 6,2 uU/ml bei 120 ± 8 Minuten an (Abb. 4).
Bei 150 Minuten liegt die Seruminsulinkonzentration immer noch bei 14,1 ± 4,3 uU/ml.
Der Blutglukosespiegel verringert sich von etwa 79 mg/dl bei 0 Minuten auf einen Niedrigstwert von 47 mg/dl bei 135 Minuten.
Die Fläche unter der Insulinkonzentrations-Zeitkurve wurde mit 1852 ± 273 uU/ml x Min. berechnet.

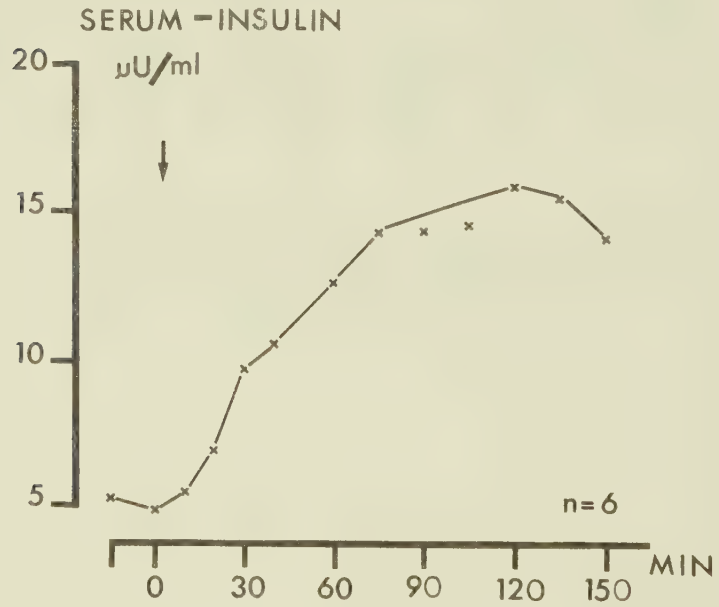

Abb. 4: Seruminsulinkonzentration nach Injektion von 10 E Optisulin (Hoe 01) CS und 16 E Optisulin Depot (Hoe 03) CS .

Wird erst 5 Minuten nach der Durchmischung von 10 E Optisulin (Hoe 01) CS und 16 E Optisulin Depot (Hoe 03) CS in einer Spritze injiziert, so steigt der Insulinspiegel ausgehend von 5,0 ± 0,7 µU/ml bei 0 Minuten auf einen Höchstwert von 15,8 ± 4,0 µU/ml bei 90 ± 6 Minuten an (Abb. 5).
Der Blutglukosespiegel fällt von 78 mg/dl bei 0 Minuten auf einen Minimalwert von 46 mg/dl nach 105 Minuten ab.
Die Fläche unter der Insulinkonzentrations-Zeitkurve wurde mit 1929 ± 254 µU/ml errechnet.

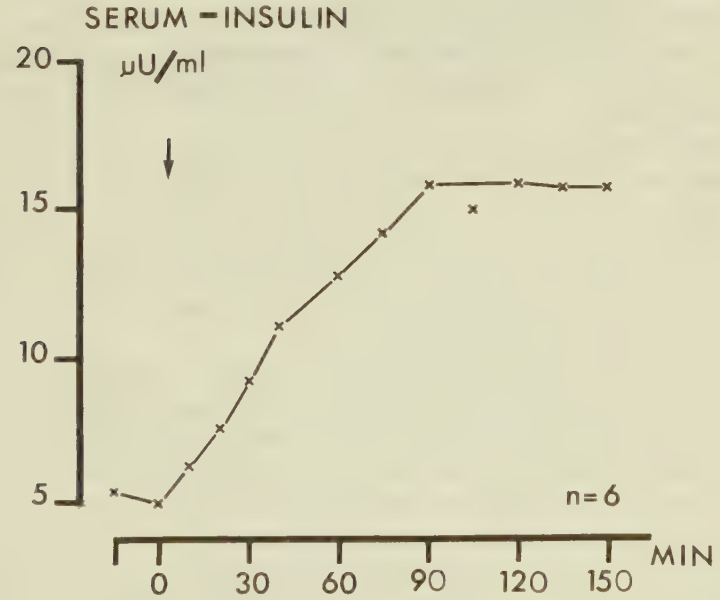

Abb. 5: Seruminsulinkonzentration nach der Injektion von 10 E Optisulin (Hoe 01) CS und 16 E Optisulin Depot (Hoe 03) CS 5 Minuten nach dem Mischen.

5.2 Diskussion

Wie bereits zuvor erwähnt, werden Verzögerungsinsuline mit Alt-Insulinen gemischt, um eine Verstärkung des Initialeffektes zu erzielen und um eine für den Patienten individuelle Kombination herstellen zu können.
So wird in der Literatur berichtet, daß sich durch eine Kombination von kurz- und langwirkenden Insulinen optimale Stoffwechseleinstellungen erreichen lassen (JOVANOVIC, 1980; TCHOBROUTSKY, 1980).
Untersuchungen über die Absorptionskinetik von DES-PHE-Insulinmischungen lieger bisher nicht vor.
Aufgrund der unterschiedlichen Präparationen von Alt- und Verzögerungsinsulinen ist es denkbar, daß es zu Wechselwirkungen zwischen beiden Insulinen kommen kann.
So beobachtete RITSCHEL schon 1973, daß bei sogenannten Cocktail-Injektionen Interaktionen zwischen den einzelnen Präparaten stattfinden können, wie z.B. Steigerung oder Minderung der Wirkung, Veränderung der gastro-intestinalen Resorption, Veränderung der Aktivität des Arzneistoffes in der Biophase.
Vergleicht man nun die Ergebnisse zwischen getrennter Injektion und Injektion in einer Spritze, so zeigt sich, daß nach dem Mischen und sofortiger Injektion in einer Spritze, als auch bei der Injektion 5 Min. nach dem Mischen keine wesentlichen Änderungen in der Absorptionskinetik nachzuweisen sind.
Gegenüber der Optisulin-Long-Untersuchung fällt jedoch auf, daß die gemessenen Seruminsulinspiegel beim Optisulin Depot-Versuch höher liegen.

Dies ist möglicherweise bedingt durch die unterschiedliche Zusammensetzung von Optisulin Long und Optisulin Depot.
Optisulin Long besteht aus 30% DES-PHE-Insulin und 70% kristallinem Insulin, Optisulin Depot besteht aus 25% DES-PHE-Insulin 75% kristallinem Insulin. Bei der Optisulin Long Untersuchung werden also 14,8 E DES-PHE-Insulin injiziert, während bei der Optisulin Depot Untersuchung nur 14 E DES-PHE-Insulin appliziert werden.
Die Hauptursache für das abweichende Verhalten von Optisulin Depot CS gegenüber Optisulin Long CS könnte also in der galenischen Zubereitung liegen, denn im Optisulin Depot CS liegt die DES-PHE-Komponente in gelöster Form vor, während im Optisulin Long CS die DES-PHE- Komponente in amorpher Form vorliegt (siehe auch Tabelle 1).

6. Zusammenfassung

Es wurde zunächst in einem Vorversuch mit Actrapid^{R} die Validität der direkten Messmethode zur Absorptionskinetik von Insulin geprüft. Da der prozentuale Fehler von 7,4 ± 1,3% für $IRI_{conc.max.}$ und 3,4 ± 0,7% für die Fläche unter der Kurve (AUC_{0-300}) unter 10% liegt, wie es für biologische Untersuchungen verlangt wird, ist somit die direkte Meßmethode hinreichend valide (siehe Seite 16).

Bei den Untersuchungen mit Optisulin (Hoe 01) S und Optisulin Long (Hoe 05) S werden niedrigere Seruminsulinspiegel gemessen im Vergleich zu Schweineinsulin-Präparationen, obwohl der blutzuckersenkende Effekt vergleichbar ist.
Warscheinlich sind immunologische Phänomene die Ursache.
Pharmakokinetische Untersuchungen zum Optisulin Depot (Hoe 03) S zeigen zwar höhere Serum-Insulin-Konzentrationen als Optisulin Long (Hoe 05) S , jedoch sind sie im Vergleich zu entsprechenden Untersuchungen mit Schweineinsulin immer noch niedriger. Die hypoglykämische Wirkung ist auch hier wieder mit Schweineinsulin-Präparationen vergleichbar.
Möglicherweise zeigen DES-PHE-Insuline im Radioimmunoassay eine geringere Antikörperbindungsfähigkeit als zum Beispiel Schweineinsuline.
Dieser Effekt muß deshalb bei der Interpretation gemessener Seruminsulinkonzentrationen berücksichtigt werden.

7. Anhang

Literaturverzeichnis

Arquilla, E. R.
Stavitsky, A. B.
The production and identification of antibodies to insulin and their use in assaying insulin.
J. Clin. Invest, 35, 458-465 (1956)

Banting, F. G.
Best, C. H.
Pancreatic extracts in the treatment of Diabetes mellitus.
Canad. med. Ass. J. 141-144 (1922)

Banting, F. G.
Campbell, W. R.
Fletcher, A. A.
Further clinical experience with insulin (pancreatic extracts), in the treatment of Diabetes Mellitus.
Brit. med. J. 8-12 (1923)

Berger, M.
Absorption kinetics of subcutaneously injected insulin. Evidence for degradation at the injection site.
Diabetologia, 7: 97-99 (1979)

Berson, S. A.
Yalow, R. S.
Baumann, A.
Rothschild, M. A.
Newerly, K.
Insulin-J 131 metabolism in human subjects: Demonstration of insulin-binding globulin in the cirkulation of insulin treated subjects.
J. clin. Invest. 35, 170-190 (1956)

Binder, C.
Absorption of injected insulin.
Acta Pharmacol. Toxicol. (suppl. 2) 27: 1-87 (1969)

Brandenburg, D. — DES-PHE-Insulin, ein kristallines Analogon des Rinderinsulins. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 350, S. 741-750 (1969)

Cüppers, H. J. — Pharmakokinetik subkutan injizierten Insulins, Klinisch Experimentelle Untersuchungen zur Insulin-Absorption. Habilitationsschrift Universität Düsseldorf, (1980)

Falta, W. — Über einen insulinrefraktären Fall von Diabetes Mellitus. Klin. Wschr. 3 1315-1317 (1924)

Geiger, R.
Schöne, H. H.
Pfaff, W. — Bis-tert.-butyloxycarbonyl-insulin Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 352, S. 1487-1490, (1973)

Hasche, H.
Willms, B. — Klinische Erfahrungen mit DES-PHE-Insulinen. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 82 S. 779-782 (1976)

Jovanovic, L.
Petersen, C. M.
Saxena, B. B.
Dawood, Y.
Daudek, C. D. — Feasibility of maintaining normal glucose profiles in insulin-dependent Pregnant diabetic woman. Am. J. Medicine 68: 105-112 (1980)

Kerp, L.
Kasemir, H.
Kieling, F. — Insulinbindende Antikörper und Insulinbedarf bei Diabetikers. Klin. Wochenschr. 46: 376-385 (1968)

Kerp, L.
Steinhilber, S.
Kieling, F.
Creutzfeldt, W.
Klinische und experimentelle Untersuchungen zur Insulinallergie und Insulinresistenz
Dtsch. Med. Woschr. No 18
S. 806- 814 (1965)

Klotz, U.
Klinische Pharmakokinetik Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1979)

Ledermann, H.
Glocke, M.
Grundzüge klinischer Arzneimittelprüfung und medizinischer Statistik.
3 Auflage, Verlag Witzstrock
Baden-Baden, Köln, New York (1982)

Lindsay, D. G.
Shall, S.
The acetylation of insulin.
Biochem. J. 121, 737-741 (1971)

Ritschel, W. A.
Angewandte Biopharmazie Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1973

Sachse, G.
Federlin, K.
Sind DES-PHE-Insulin-haltige Insulinmischungen handelsüblichen Präparaten vorzuziehen.
Med. Klin. 76 319-323 (1981)

Sachse, G.
Mäser, E.
Schäfer, D.
Federlin, K.
DES-PHE-Insulinhaltiges Intermediärinsulin im Vergleich mit handelsüblichen Präparaten.
Dtsch. med. Wschr. 107: 332-335 (1980)

Sachse, G.
Federlin, K.
DES-PHE-Insulinhaltige Insuline im intraindividuellen Vergleich zuhandelsüblichen Präparaten.
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 86 953-1955 (1980)

Santeusanio, F.
Clinical Trial with porcine DES-PHE-Insulin.
Diabete & Metabolisme 7, 173-179 (1981)

Tschobroutsky, G.
Charitanski, D.
Blouquit, Y.
Papoz, L.
Soria, J.
Rosa, J.
Diabetic control in 102 insulintreated out - patients.
Diabetologia 18 447-452 (1980)

Tuft, L.
Insulin Hypersensitiveness: Immunologic considerationes and Case reports.
Amer. J. Med. Sci. 176 707-720 (1928)

Velcovsky, H. G.
Federlin, K.
Die Bestimmung von Anti-Insulin IgE-Antikörpern bei Patienten mit einer Insulinallergie.
Wien. klin. Wschr. 88: 36-37 (1976)

Weber, U.
Weitzel, G.
Synthetische B-Ketten mit Variierter Sequenz.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, S. 1431-1433 (1967)

Wide, L.
Porath, F.

Radioimmunoassay of proteins with the use of sephadex-coupled antibodies. Biochem. Biophys. Acta 130, 257-259 (1966)

7.1 Danksagung

Für die Überlassung des Themas sowie die ständige Betreuung und wertvollen Hinweise gilt mein besonderer Dank Herrn Priv. Doz. Dr. H. J. Cüppers. Für ausgezeichnete Assistenz darf ich mich bei Frau Schütte, Frau Broermann und Frl. Sluga sehr herzlich bedanken.

7.2 Lebenslauf

Victor Heinzle

Personalien: Geboren am 07.09.1952 in Schramberg als Sohn der Eheleute Erich Heinzle und Erika Heinzle, geb. Schairer.

Ausbildung :

1959 - 1964	Grundschule
1964 - 1972	Gymnasium
22.06.1972	Abitur
01.10.72 - 30.09.74	Bundeswehr
01.10.1974	Immatrikulation in Freiburg Studienfach Physik
Im WS 1976/77	Immatrikulation an der Uni Düsseldorf für das Fach Zahnheilkunde
28.02.1977	Naturwissenschaftl. Vorprüfung
10.10.1978	Zahnärztliche Vorprüfung der ZHK
27.05.1981	Zahnärztliche Prüfung im Frühjahr 1981
04.06.1981	Bestallung zum Zahnarzt

FOTODRUCK J. MAINZ – Telefon: (02 41) 2 73 05
Neupforte 13, Nähe Markt, 5100 Aachen